

## 関節軟骨の脂質代謝に関する研究

### 第2報 関節軟骨細胞の脂質合成における脂肪酸の影響\*

長 尾 正 人

札幌医科大学整形外科科学講座 (主任 石井清一 教授)

## Studies on Lipid Metabolism in Articular Cartilage

### II. Effects of Exogenous Fatty Acids on Lipid Synthesis of Articular Chondrocytes

Masato NAGAO

Department of Orthopedic Surgery, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. S. Ishii)

Cultured articular chondrocytes were supplemented with various concentrations of oleate, linoleate and arachidonate. Effects of the fatty acid-supplement on lipid synthesis of the chondrocytes were examined. The results obtained are as follows:

1) The biosynthesis of triacylglycerol(TG) and phosphatidylcholine(PC) in the cultured chondrocytes was found to be regulated by fatty acid concentrations in the culture medium. At high concentrations of the fatty acids, TG biosynthesis was markedly enhanced. The biosynthesis of PC was also increased, while that of phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol was not effected by the concentration of extracellular fatty acids.

2) In spite of a very low arachidonate content in TG, [ $^3\text{H}$ ] arachidonate incorporated significantly into TG when cultured with high concentrations of arachidonate. This finding suggests that TG in the chondrocyte is a strage site of arachidonate as indicated in other cell types.

3) Labeling profiles of PC molecular species with [ $^3\text{H}$ ] glycerol were almost similar among 16:0/18:1, 16:0/18:2 and 16:0/20:4 species, including that of 16:0/20:4 which may be formed via the *de novo* pathway in the chondrocytes.

4) When cultured with high concentrations of each unsaturated fatty acid, qualitatively different molecular species were formed. The proportion of palmitoyl-unsaturated species decreased, while that of specific unsaturated-unsaturated species increased. The significant increases were shown in 18:1/18:1 and 18:1/18:2 species of the high oleate-supplement, 16:1/18:2 species of the high linoleate-supplement and probably 18:2/20:4 species of the high arachidonate-supplement.

(Received January 22, 1986 and accepted May 26, 1986)

**Key words:** Articular chondrocytes, Lipid metabolism, Arachidonic acid, Phosphatidylcholine molecular species

## 1 緒 言

関節軟骨細胞は高度に分化した細胞で、プロテオグリカンやII型コラーゲンなどの細胞外軟骨基質の生成

と維持の役割を担い、細胞と細胞外基質の平衡状態を保つ関節軟骨の中心的存在である。Stockwell<sup>1)</sup>は組織学的に年齢が高くなるほど軟骨細胞及び関節軟骨における脂質の沈着を認めている。Bonner *et al.*<sup>2)</sup>は、ヒ

\* 本研究は秋野豊明教授の指導のもとに札幌医科大学学生化学第1講座で行われたものである。

ト関節軟骨における脂質分析を行い、高齢になるほど脂質量の増加を認め、関節軟骨における脂質の蓄積と軟骨変性との関連を示唆している。また、Kirkpatrick *et al.*<sup>3)</sup>は、培養軟骨細胞を高濃度アラキドン酸やジホモ- $\gamma$ -リノレン酸で培養すると細胞内に脂肪滴の沈着を認めている。一方、関節軟骨細胞がプロスタグランジンを産生する<sup>4-6)</sup>ことが示され、また、プロスタグランジンがこの細胞におけるプロテオグリカンの生成を調節している<sup>7)</sup>ことが報告されている。これらの事実は、関節軟骨の生理及び病態形成に脂質代謝が深く関わっていることを示唆するものといえよう。しかし、関節軟骨細胞への脂質沈着の機序及びこの細胞における脂質代謝の基礎的検討を行った報告はない。

ジアシルグリセロール (DG) を分岐点とするトリアシルグリセロール (TG) とリン脂質の合成が細胞外液の脂肪酸濃度によって調節されていることが、肝細胞<sup>8,9)</sup>、血管平滑筋細胞<sup>10)</sup>、血管内皮細胞<sup>11)</sup>などで示されてきた。これらの細胞では細胞外液の脂肪酸濃度の上昇に伴って脂肪酸がTGへ蓄積される。また、プロスタグランジンを生成することが知られている血管平滑筋細胞<sup>10)</sup>、血管内皮細胞<sup>11)</sup>、3T3-L1細胞<sup>12)</sup>はTGにアラキドン酸を大量に取り込み、TGに結合したアラキドン酸は膜リン脂質へのアラキドン酸の供給とturnoverに関して重要な役割を持つことが指摘されている。本研究はこれら他細胞で見られた知見をもとに、培養関節軟骨細胞におけるTGとリン脂質合成に対する細胞外脂肪酸、特にアラキドン酸など不飽和脂肪酸の影響を検討し、関節軟骨細胞脂質代謝の特色を明らかにした。

## 2 実験材料及び方法

### 2.1 実験材料

生後4週の幼若家兔（日本白色種）の肩、股、膝関節より得られた関節軟骨を用いた。

コラゲナーゼ (Clostridiopeptidase A, type I), ホスホリパーゼC (C. perfringens, type I 及び B. cereus, type III) は Sigma 社 (St. Louis, Mo.), 牛胎仔血清 (FCS, Lot. No. 3C045) は M. A. Bioproducts 社 (Walkersville, Md.), Ham F12 培地は日水製薬、高速液体クロマトグラフィー用溶媒としてアセトニトリル、イソプロパノール、水は片山化学、*tert*-ブチルメチルエーテルは東京化成工業よりそれぞれ購入した。オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸は半井化学、[1-(3)-<sup>3</sup>H] グリセロール (specific activity 3.0 Ci/mmol), [1-<sup>14</sup>C] オレイン酸 (56 mCi/mmol), [1-<sup>14</sup>C] リノール酸 (59 mCi/mmol), [5, 6, 8, 9, 11, 12,

14, 15-<sup>3</sup>H] アラキドン酸 (163 Ci/mmol) は Amersham International plc. (Buckinghamshire, England) より購入した。薄層板は Merck 社 (Darmstadt, FRG) のシリカゲル 60TLC プレート (20×20 cm, 厚さ 0.25 mm) を用いた。

コールドキャリアーとして家兎肝、肺より Bligh and Dyer<sup>13)</sup> 法で抽出した総脂質及びこの総脂質からホスファチジルコリン (PC) を分離して用いた。PC は展開溶媒クロロホルム/メタノール/アンモニア/水 (70:30:3:2, v/v) の TLC で分離した。回収した PC は後述する二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) で単一スポットであることを確認した。

### 2.2 関節軟骨細胞の培養

生後4週の幼若家兎を、耳静脈よりネンブタール (pentobarbital sodium) を静注して屠殺後、肩、股、膝関節より無菌的に関節軟骨を採取した。この際、軟骨下組織の混入がないよう細心の注意を払った。採取した軟骨片は phosphate buffered saline (PBS) にて3回洗浄した後、ハサミを用いて約 1 mm<sup>3</sup> の大きさに細切した。その細切片を三角フラスコに移し、10% FCS 添加 Ham F12 培養液で 0.2% に調製したコラゲナーゼで 37°C, 3 時間酵素処理を行った。次いで、白金網 (80 メッシュ, 池本理化) で濾過しコラゲナーゼで分解されていない軟骨片を除いた後、単離した細胞を PBS で3回洗浄してコラゲナーゼを除き細胞浮遊液とした<sup>14)</sup>。

φ 35 mm culture dish (Nunc 社, Denmark) に 2.0×10<sup>5</sup> 個ずつ接種し、10% FCS 添加 Ham F12 培養液 (0.01% ストレプトマイシンを含む) を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養した。

### 2.3 軟骨細胞の標識

#### 2.3.1 グリセロールによる標識

脂肪酸添加実験の場合は各種脂肪酸を 0.1 N NaOH を用いて Denning *et al.*<sup>15)</sup> の方法により Na 塩として使用した。2.2 の条件で 48 時間培養した培養液にオレイン酸、リノール酸、アラキドン酸をそれぞれ別個に 50, 250, 500  $\mu$ M 添加し、37°C で 8 時間プレインキュベートした。脂肪酸無添加の場合は、2.2 の条件で 8 時間培養した。その後、培養液を吸引し、ただちに [1-(3)-<sup>3</sup>H] グリセロール 25  $\mu$ Ci/ml を加えた 10% FCS 添加 Ham F12 培養液でさらに 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、氷冷 PBS で 3 回洗浄し、メタノール 1.5 ml を加えて反応を停止させ、ラバーポリスマンを用いて culture dish 上の細胞を剝離、小試験管へ移して脂質を抽出した。

#### 2.3.2 脂肪酸による標識

[ $^{14}\text{C}$ ] オレイン酸, [ $^{14}\text{C}$ ] リノール酸, [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸を培養液にそれぞれ最終濃度 5, 50, 250, 500  $\mu\text{M}$  となるように調製し, 37°C で 8 時間インキュベートした。インキュベーション後, 1% 牛血清アルブミン (fatty acid free, Sigma 社) 添加氷冷 PBS で 3 回洗浄し, メタノール 1.5 ml を加えて反応をストップさせ, ラバーポリスマンを用いて細胞を剝離, 小試験管へ移して脂質を抽出した。なお, 培養液における標識脂肪酸の比活性は脂肪酸濃度 5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  では [ $^{14}\text{C}$ ] オレイン酸 44,000 dpm/nmole, [ $^{14}\text{C}$ ] リノール酸 44,000 dpm/nmole, [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸 88,000 dpm/nmole, 250  $\mu\text{M}$  では [ $^{14}\text{C}$ ] オレイン酸 17,600 dpm/nmole, [ $^{14}\text{C}$ ] リノール酸 17,600 dpm/nmole, [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸 35,200 dpm/nmole, 500  $\mu\text{M}$  では [ $^{14}\text{C}$ ] オレイン酸 8,800 dpm/nmole, [ $^{14}\text{C}$ ] リノール酸 8,800 dpm/nmole, [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸 17,600 dpm/nmole であった。

#### 2.4 脂質抽出と脂質の分析

小試験管へ移した細胞にクロロホルム 3 ml を加えてホモゲナイズし, Folch *et al.*<sup>15)</sup> の方法で脂質を抽出した。シリカゲル (Wakogel C-200, 和光純薬) を充填した 0.5×5 cm のカラムクロマトグラフィーで, 中性脂質及びリン脂質に分離した。すなわち, クロロホルム溶出画分を中性脂質画分, メタノール溶出画分をリン脂質画分とした。

リン脂質画分の一部に, キャリヤーとして家兎肝より抽出した総脂質抽出液 0.6  $\mu\text{mole}$  を加えて薄層板にスポットし, 二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。一次元方向へクロロホルム/メタノール/ジイソブチルケトン/酢酸/0.4 M ホウ酸水 (45:15:30:10:4, v/v), 二次元方向へクロロホルム/メタノール/ジイソブチルケトン/ピリジン/水 (30:25:25:35:8, v/v) の溶媒系で展開後, さらに一次元方向へアセトンで 2 回展開し, ヨウ素蒸気により脂質を検出した。次いで, 薄層板から各リン脂質のスポット部分のシリカゲルをかきだし, シンチレーションバイアルに移し液体シンチレーションカウンター (Beckman 社, LS-9000) にて放射活性を測定した。

中性脂質画分に, 同様に家兎肝総脂質抽出液を加えて薄層板にスポットし, 展開溶媒へキサン/エーテル/酢酸 (120:80:1, v/v) で展開後, ヨウ素蒸気で脂質を検出, 各中性脂質のスポット部分のシリカゲルをかきだし放射活性を測定した。

#### 2.5 ホスファチジルコリン分子種の分析

##### 2.5.1 硝酸銀薄層クロマトグラフィーによる分子種群の分離

[ $^3\text{H}$ ] グリセロール標識のリン脂質画分から上記の二次元 TLC で PC を分離し, 0.2% ジクロロフロロレッセン・エタノール液を噴霧後, 紫外線下で検出, PC スポット部分をかきだして, PC を Arvidson<sup>16)</sup> 法で回収した。得られた標識 PC に家兎肝及び肺より精製した PC 各 1  $\mu\text{mole}$  をコールドキャリヤーとして加え, Okano *et al.*<sup>17)</sup> の方法によりホスホリパーゼ C で加水分解し, 1, 2-ジアシルグリセロール (1, 2-DG) とした後, 無水ピリジンに溶解, 無水酢酸を加えて 37°C, 1.5 時間インキュベートしてアセチル化を行った。次いで, 薄層板にスポットし, ヘキサン/エーテル/ギ酸 (120:40:3, v/v) の溶媒で展開, 1, 2-ジアシル-3-アセチルグリセロール (DG-acetate) を調製した。この DG-acetate を, Okano *et al.*<sup>17)</sup> の報告に従って, 硝酸銀 TLC により不飽和結合数によって分離される分子種群 (molecular class) に分離した。すなわち, PC 由来 DG-acetate を飽和, モノエン, ジエン, トリエン, テトラエン, ポリエン分子種群に分離した。これらの分子種群を 0.2% ジクロロフロロレッセン・エタノール液で検出後 Arvidson<sup>16)</sup> 法により回収, その一部を用いて放射活性を測定した。

##### 2.5.2 高速液体クロマトグラフィーによる分子種の分析\*

PC の個々の分子種を, Itoh *et al.*<sup>18)</sup> の方法を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離した。すなわち, BAS (Bioanalytical System Inc., USA) 製シングルポンプタイプに, 溶媒脱気装置 (ERC-3310, エルマ光学) を併用した。カラムは, 内径 6 mm×長さ 10 cm (ERC-ODS-1161, エルマ光学) を 2 本及び 5.5 cm のリードカラム (ERC-ODS-1642, エルマ光学) を接続し, 室温にて用いた。溶媒は, Nakagawa and Horrocks<sup>19)</sup> の方法によりアセトニトリル/イソプロパノール/*tert*-ブチルメチルエーテル/水 (72:18:8:2, v/v) の単一移動相を用いた。検出器は示差屈折計 (Refractometry detector, ERC-7520, エルマ光学) を用いた。流速は 0.5~1.0 ml/min とした。 [ $^3\text{H}$ ] グリセロール標識 PC については硝酸銀 TLC で分離, 回収したモノエン, ジエン, テトラエン各分子種群をそれぞれ HPLC を用いてさらに個々の分子種に分離し, 相当する分子種ピークを回収し放射活性を測定した。脂

\* 分子種を脂肪酸の組み合わせで表記した。脂肪酸は炭素数:二重結合で表記し, 脂肪酸の位置の違いは区別していない。

脂肪酸標識 PC については、DG-acetate を直接 HPLC に注入後、15 または 20 秒おきに溶出液を分取し、各画分の放射活性を測定した。

## 2.6 牛胎仔血清中の遊離脂肪酸の分析

FCS (M. A. Bioproducts, Lot. No. 3C045) 中の TG, 総コレステロール, 遊離コレステロール, 遊離脂肪酸, リン脂質値を測定した。FCS 20 ml の脂質を Bligh and Dyer<sup>13)</sup> 法で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで中性脂質及びリン脂質に分離した。中性脂質画分を薄層板にスポットし、ヘキサン/エーテル/酢酸 (120:80:1, v/v) で遊離脂肪酸を分離、0.2% ジクロロフローレッセン・エタノール液で検出後、メチル化し<sup>20)</sup>、ガスクロマトグラフィーを用いて分析した。脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィーによる分析は前報<sup>14)</sup>に記した方法によった。

## 2.7 その他の測定法

蛋白質の測定は牛血清アルブミン (fraction V, Sigma 社) を標準として、Lowry *et al.*<sup>21)</sup> の方法で行った。TG, 総コレステロール, 遊離コレステロール, 遊離脂肪酸はデタミナーキット (協和メデックス) を用い酵素法で測定した。脂質リンは Bartlett<sup>22)</sup> 法で測定した。放射活性はシリカゲルを含む場合は ACSII (Amersham International plc., Buckinghamshire, England), シリカゲルを含まない場合はトルエンシンチレーター<sup>23)</sup>を用い、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

**Table 1** Lipid content of fetal calf serum (M. A. Bioproducts, Lot. No. 3C045) used for cell cultures of articular chondrocytes.

Total Cholesterol	270 mg/l
Free Cholesterol	70 mg/l
Triacylglycerol	640 mg/l
Phospholipid	400 mg/l
Total free fatty acid	127 $\mu$ mole/l
Individual fatty acid* ( $\mu$ M)	
16:0	34.0
16:1	6.1
18:0	17.3
18:1	27.8
18:2	5.4
20:4	14.7
20:5	2.8
22:5	2.8
22:6	4.8
Others	11.3
Total protein	32 g/l

\* Fatty acid; carbon number: double bond number

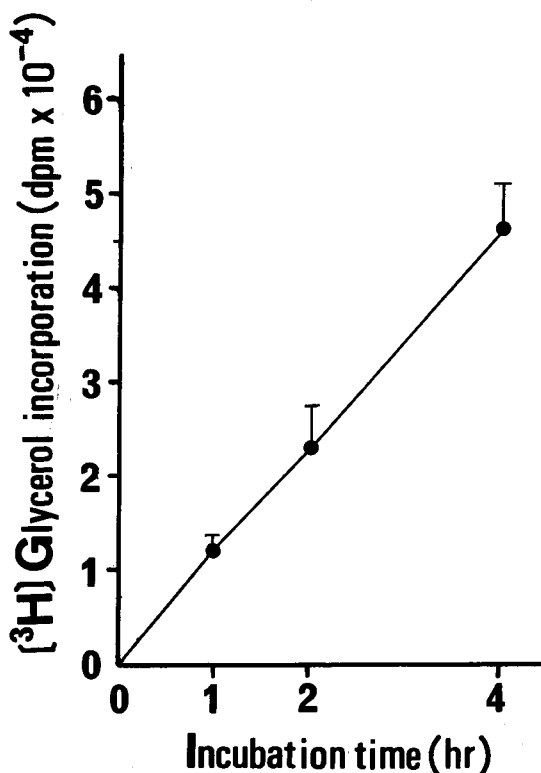
## 3 成 績

### 3.1 牛胎仔血清の脂質分析

関節軟骨細胞の培養に用いた FCS (M. A. Bioproducts, Lot. No. 3C045) 中の脂質分析の結果は Table 1 に示す通りであった。遊離脂肪酸濃度は 127  $\mu$ M でオレイン酸, リノール酸, アラキドン酸はそれぞれ 27.8  $\mu$ M, 5.4  $\mu$ M, 14.7  $\mu$ M であった。従って培養液 (10% FCS 添加 Ham F12) 中の遊離脂肪酸濃度は 13.0  $\mu$ M, オレイン酸は 2.8  $\mu$ M, リノール酸は 0.8  $\mu$ M, アラキドン酸は 1.5  $\mu$ M となる。

### 3.2 [<sup>3</sup>H] グリセロールの関節軟骨細胞脂質への取り込み

培養軟骨細胞総脂質への [<sup>3</sup>H] グリセロールの取り込みは、検索したインキュベーション 4 時間まで linear に上昇した (Fig. 1)。すなわち、この細胞はグリセロキナーゼを有しグリセロリン酸から脂質合成を行うこ



**Fig. 1** Time course of [<sup>3</sup>H] glycerol incorporation into total lipids of articular chondrocytes. Cells ( $2.0 \times 10^5$  cells/dish) were incubated in Ham F12 supplemented with 10% FCS for various time. Vertical lines represent mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

**Table 2** [ $^3\text{H}$ ] Glycerol incorporation into individual lipids after incubation for 2 hours.

	dpm <sup>a)</sup>	Radioactivity % of individual lipid	Mass % of individual lipid <sup>14)</sup>	Relative specific activity <sup>b)</sup>
Total lipid	21880 $\pm$ 5160			
Triacylglycerol	9290 $\pm$ 2438	42.6	22.4	1.9
Phosphatidylcholine	8587 $\pm$ 1962	39.2	32.9	1.2
Lyso-phosphatidylcholine	138 $\pm$ 32	0.6	2.0	0.3
Phosphatidylethanolamine	1246 $\pm$ 285	5.7	14.0	0.4
Phosphatidylinositol	931 $\pm$ 213	4.3	5.6	0.8
Phosphatidylserine	969 $\pm$ 221	4.4	5.7	0.8
Sphingomyelin	113 $\pm$ 26	0.5	2.0	0.3
Cardiolipin	50 $\pm$ 12	0.2	0.5	0.4
Others	556 $\pm$ 153	2.5	14.9	0.2

a) Values represent mean  $\pm$  S. D. from three independent analyses.

b) Relative specific activity =  $\frac{\text{Radioactivity \% of individual lipid}}{\text{Mass \% of total lipid}}$

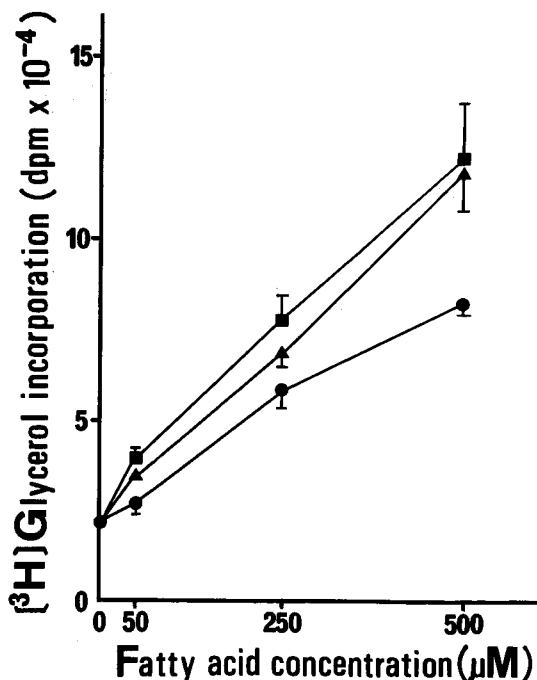
とのできる細胞であることが確認された。Table 2 はインキュベーション 2 時間後における各脂質への [ $^3\text{H}$ ] グリセロールの取り込みを示す。10% FCS 添加 Ham F12 培養液での培養軟骨細胞脂質へ取り込まれた総放射活性の 42.6% が TG, 39.2% が PC であり、この両者が主要標識脂質であった。前報<sup>14)</sup> に示した脂質組成と取り込まれた放射活性比率から各脂質の比活性 (Relative specific activity) を求めると、TG が最も高く、次いで PC であり、TG は PC の約 1.5 倍の速さで代謝回転していると思われた。

次いで、この培養軟骨細胞の脂質合成に及ぼす脂肪酸添加の影響を検討した。すなわち、48 時間培養した軟骨細胞に種々の濃度の不飽和脂肪酸を加えて 8 時間培養し、この細胞脂質への [ $^3\text{H}$ ] グリセロールの取り込みを検討した。培養液中のオレイン酸、リノール酸、アラキドン酸濃度の上昇と共に [ $^3\text{H}$ ] グリセロールの取り込みはほぼ linear に増加し、オレイン酸で培養した細胞よりリノール酸、アラキドン酸と共に培養した細胞の方が脂質合成は活発であった (Fig. 2)。

この場合の各脂質への [ $^3\text{H}$ ] グリセロールの取り込みを Fig. 3 に示す。脂肪酸無添加の場合は Table 2 に示したように TG と PC への取り込みはほぼ同じであるが、培養液中の脂肪酸濃度の上昇に伴って TG への取り込みが著しく増加した。すなわち、細胞外液中オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸の濃度依存性に TG 合成は促進された。TG に次いで、PC への取り込みも脂肪酸添加培養により増加したが、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI) への取り込みは細胞外脂肪酸濃度によって変化しなかつ

た。

次に [ $^3\text{H}$ ] グリセロールを取り込ませた細胞の脂質抽出液から PC を分離し、硝酸銀 TLC と HPLC の組



**Fig. 2** Effects of oleate (●), linoleate (▲) or arachidonate (■) concentration on the [ $^3\text{H}$ ] glycerol incorporation into total lipids of articular chondrocytes. ( $2.0 \times 10^5$  cells/dish). Vertical lines represent mean  $\pm$  S. D. of three experiments.

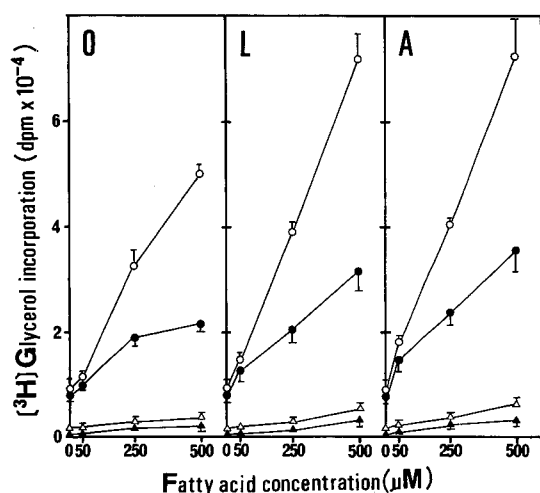


Fig. 3 Effects of fatty acid exposure on the  $[^3\text{H}]$  glycerol incorporation into triacylglycerol (○), phosphatidylcholine (●), phosphatidylethanolamine (Δ) and phosphatidylinositol (▲). O; oleate exposure, L; linoleate exposure, A; arachidonate exposure. Vertical lines represent mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

み合わせて  $[^3\text{H}]$  グリセロールの PC 分子種への取り込みを検索した (Table 3, Fig. 4). 脂肪酸無添加の培養液で細胞 PC へ取り込まれた放射活性のうちモノエン種が最大 (26.3%) で、モノエン種の中では 16:0/18:1 分子種への取り込みが大半を占めた。ジエン種、テトラエン種、ポリエン種への取り込みは 18~19% でほぼ同じであった。個々の分子種の放射活性は、オレイン酸高濃度培養では 16:0/18:1, リノール酸高濃度培養では 16:0/18:2 及び 16:0/20:4, アラキドン酸高濃度培養では 16:0/20:4 が高かった。この結果は、細胞外の不飽和脂肪酸は細胞に取り込まれ、それぞれの不飽和脂肪酸から構成される PC 分子種の合成に利用されていることを示す。この場合、これらの不飽和脂肪酸とパルミチン酸との組み合わせの分子種、つまりパルミトイル分子種が、ステアロイル分子種よりも活発に合成されることが示された。

### 3.3 標識脂肪酸の関節軟骨細胞脂質への取り込み

標識脂肪酸の総脂質への取り込みはオレイン酸, リノール酸, アラキドン酸共に培養液中のそれぞれの脂肪酸の濃度依存性に増加した (Fig. 5). オレイン酸とリノール酸の取り込みは、細胞外濃度 250  $\mu\text{M}$  で飽和傾

Table 3 Distribution of radioactivity among molecular species of phosphatidylcholine after 2 hour-incubation with  $[^3\text{H}]$  glycerol in articular chondrocytes exposed for 8 hours with 500  $\mu\text{M}$  oleate, linoleate or arachidonate.

Molecular class	Molecular species	Radioactivity (% distribution)			
		None <sup>a)</sup>	Oleate (500 $\mu\text{M}$ ) <sup>b)</sup>	Linoleate (500 $\mu\text{M}$ ) <sup>b)</sup>	Arachidonate (500 $\mu\text{M}$ ) <sup>a)</sup>
Saturates		7.8 $\pm$ 2.8	10.3	7.8	9.6 $\pm$ 4.7
Monoenes		26.3 $\pm$ 6.1	29.0	11.7	7.4 $\pm$ 3.5
	16:0/16:1	4.9(18.6)	3.0(10.3)	1.0(8.5)	0.9(12.2)
	16:0/18:1	19.7(74.9)	23.4(80.7)	9.6(82.1)	5.5(74.3)
	18:0/18:1	1.7(6.5)	2.6(9.0)	1.1(9.4)	1.0(13.5)
Dienes		19.0 $\pm$ 1.3	10.9	25.1	18.7 $\pm$ 6.4
	16:0/18:2	10.5(55.5)	6.5(59.6)	16.0(63.7)	11.5(61.5)
	18:0/18:2, 18:1/18:1	8.5(44.5)	4.4(40.4)	9.1(36.3)	7.2(38.5)
Trienes		10.8 $\pm$ 2.9	11.1	15.4	14.5 $\pm$ 3.2
Tetraenes		18.5 $\pm$ 4.4	13.6	24.3	26.5 $\pm$ 1.5
	18:1/18:3	1.6(8.6)	1.3(10.3)	2.3(9.5)	1.7(6.4)
	16:0/20:4	12.6(68.2)	8.4(61.8)	16.7(68.7)	18.9(71.3)
	18:0/20:4	4.3(23.2)	3.8(27.9)	5.3(21.8)	5.9(22.3)
Polyenes		17.6 $\pm$ 1.3	25.1	15.7	23.3 $\pm$ 5.3

a) Values represent mean  $\pm$  S.D. from three independent samples.

b) Values represent the mean of two independent samples.

Values in parenthesis represent percent distribution among each molecular class.

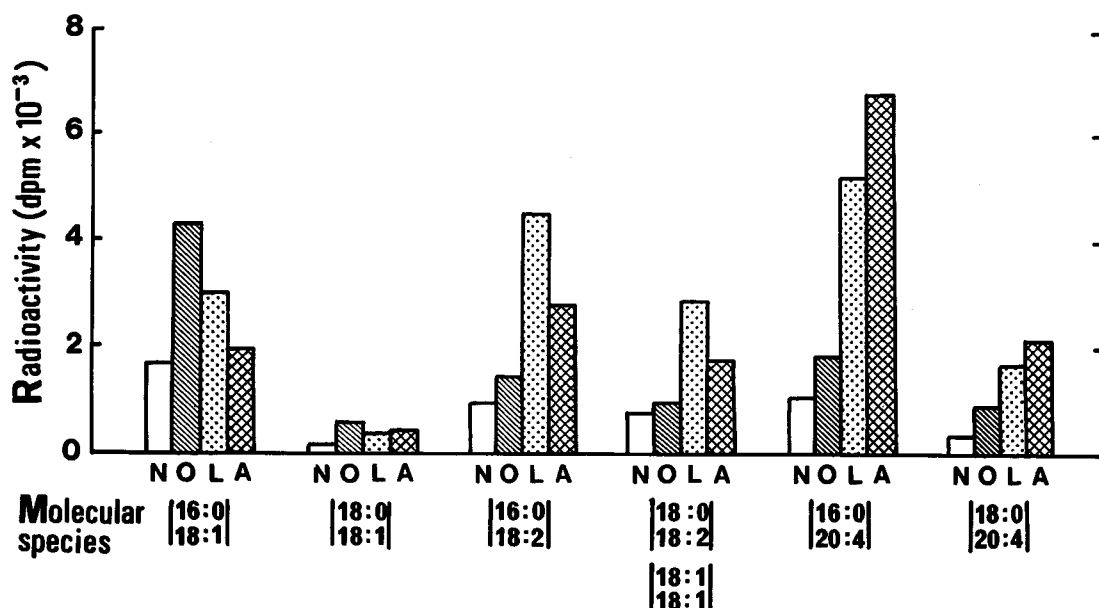


Fig. 4 [<sup>3</sup>H] Glycerol incorporation into individual molecular species of phosphatidylcholine of articular chondrocytes. Fatty acid is expressed as carbon number: double bond number. N; not exposed by fatty acid, O; oleate exposure (500 μM), L; linoleate exposure (500 μM), A; arachidonate exposure (500 μM). Results represent mean of three experiments.

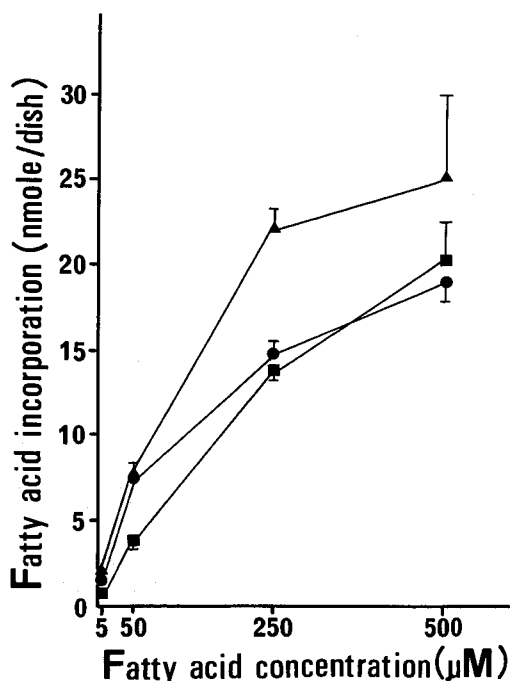


Fig. 5 Effects of oleate (●), linoleate (▲) or arachidonate (■) exposure on its incorporation into total lipids of articular chondrocytes. Vertical lines represent mean ± S.D. of three experiments.

向がみられるが、アラキドン酸の取り込みは細胞外濃度 500 μM まで増加傾向にあった。

培養液中の脂肪酸濃度が 5 μM の時、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸は TG よりも PC へ多く取り込まれるが、脂肪酸濃度 50 μM の時、この関係は逆転し、さらに脂肪酸濃度が高くなると TG への取り込みが PC への取り込みをはるかに越えた (Fig. 6). TG に次いで PC への取り込みも培養液中脂肪酸濃度に伴って増加するが、オレイン酸、アラキドン酸の取り込みは脂肪酸濃度 250 μM で飽和傾向がみられた。PC への取り込みに対する TG への取り込みは、脂肪酸濃度 500 μM の時、オレイン酸では 1.7 倍、リノール酸では 1.8 倍であるが、アラキドン酸では 4 倍であった。すなわち、細胞外アラキドン酸が高濃度の時、PC よりも TG へ著しくアラキドン酸が取り込まれることが注目された。PE, PI へのアラキドン酸の取り込みは、細胞外脂肪酸濃度の上昇と共に、わずかに増加するが、オレイン酸、リノール酸の取り込みは大きな変化はなかった。

各標識脂肪酸の PC 分子種への取り込み結果を Fig. 7 及び Table 4 に示す。細胞外オレイン酸が低濃度 (5 μM) の時に比べ高濃度 (500 μM) では、16:0/18:1 の割合は低下し、不飽和-不飽和型分子種、つまり 18:1/18:1, 18:1/18:2 の割合が著しく増加した。

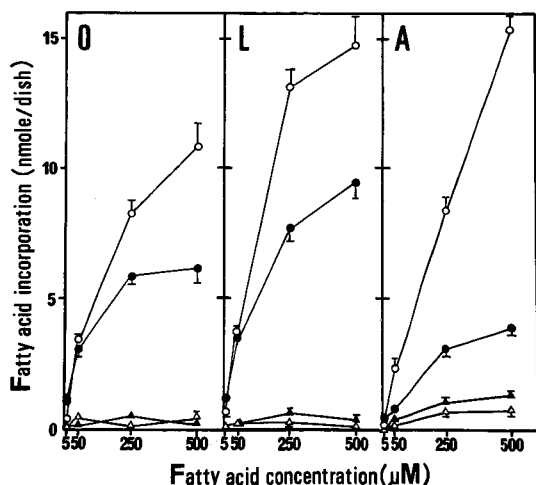


Fig. 6 Effects of fatty acid exposure on its incorporation into triacylglycerol (○), phosphatidylcholine (●), phosphatidylethanolamine (△) and phosphatidylinositol (▲). O; oleate exposure, L; linoleate exposure, A; arachidonate exposure. Vertical lines represent mean ± S.D. of three experiments.

リノール酸の取り込みは、低濃度培養では 16:0/18:2 (32.7%), 16:1/18:2 (34.4%) の割合はほぼ同じであるが、高濃度培養では 16:0/18:2 の割合は低下し、代わって 16:1/18:2 の割合が著しく増加した。アラキドン酸の取り込みは、低濃度培養では 16:0/20:4 の比率 (54.4%) が最大であり、高濃度培養でも 16:0/20:4 の比率は低下するが、なお分子種中で最大であった。しかし、この場合 A-1 ピーク (18:2/20:4 と想定される) の割合が著しく増加した。すなわち、特定の不飽和脂肪酸高濃度下の培養における不飽和脂肪酸の PC 分子種への取り込みでは、パルミトイル分子種の割合が低下し、代わって特定の不飽和-不飽和型分子種の割合が増加する傾向が著明であった。

#### 4 考 察

前報<sup>14)</sup>の関節軟骨細胞の脂質分析の結果は、この細胞の主要脂質は PC と TG であり、PC はオレイン酸と共に構成される分子種が主で、リノール酸、アラキドン酸含量は非常に低いこと、また PC に次ぐ主要脂質である TG のアラキドン酸含量は 1% 以下の低値である事を示した。本研究の結果は、細胞外脂肪酸が低濃度の時  $[^3\text{H}]$  グリセロールの取り込みは TG と PC でほぼ同じ、また標識脂肪酸の取り込みは PC が TG よりも高いが、細胞外脂肪酸が高濃度の際は  $[^3\text{H}]$  グリセロ-

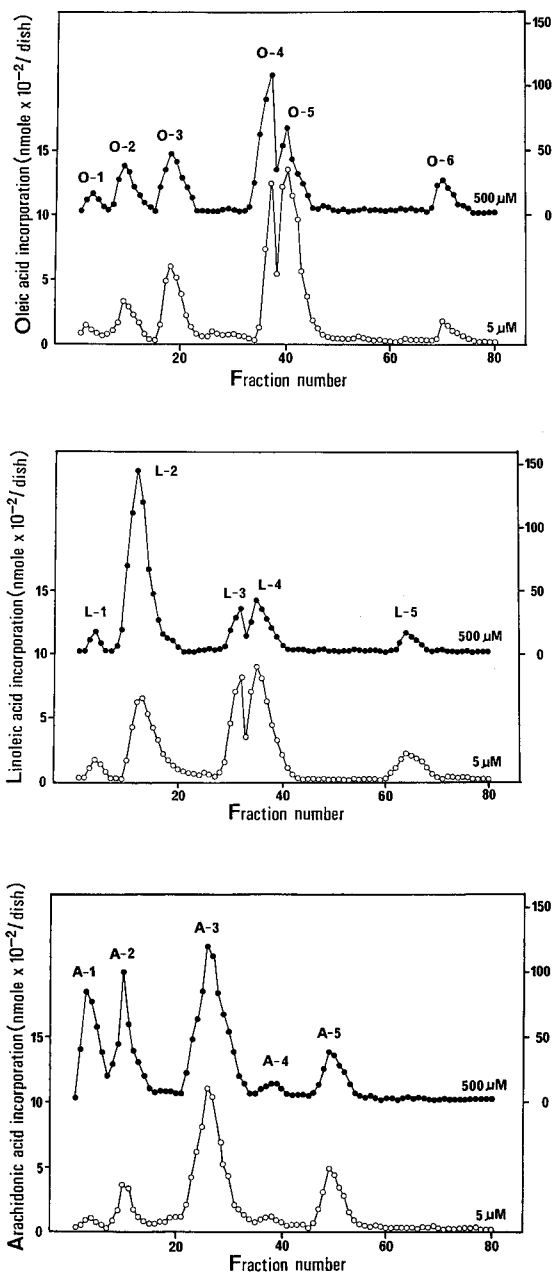


Fig. 7  $[^{14}\text{C}]$  Oleate (O),  $[^{14}\text{C}]$  linoleate (L) or  $[^3\text{H}]$  arachidonate (A) incorporation into molecular species of phosphatidylcholine of articular chondrocytes.

Cells were exposed for 8 hours with 5 μM (○) or 500 μM (●) in each fatty acid. Molecular species were separated by high-performance liquid chromatography as described in materials and methods.

The peak numbers correspond to those in Table 4.



**Table 4** *Distribution of radioactivity among molecular species of phosphatidylcholine in articular chondrocytes incubated for 8 hours with 5  $\mu$ M or 500  $\mu$ M labeled oleate, linoleate or arachidonate.*

Labeled fatty acid	Peak <sup>a)</sup>	Molecular species	% of incorporated fatty acid	
			5 $\mu$ M <sup>b)</sup>	500 $\mu$ M <sup>b)</sup>
[ <sup>14</sup> C] Oleate <sup>c)</sup>	O-1	Unidentified	2.0	4.4
	O-2	18 : 1/18 : 3	9.0	12.4
	O-3	18 : 1/18 : 2	17.9	23.9
	O-4	18 : 1/18 : 1	19.2	32.8
	O-5	16 : 0/18 : 1	46.3	19.4
	O-6	18 : 0/18 : 1	5.6	7.1
[ <sup>14</sup> C] Linoleate <sup>d)</sup>	L-1	Unidentified	4.6	2.2
	L-2	16 : 1/18 : 2	34.4	66.6
	L-3	18 : 1/18 : 2	20.2	7.4
	L-4	16 : 0/18 : 2	32.7	19.0
	L-5	18 : 0/18 : 2	8.1	4.8
[ <sup>3</sup> H] Arachidonate <sup>e)</sup>	A-1	Unidentified <sup>f)</sup>	4.5	24.1
	A-2	Unidentified <sup>g)</sup>	17.5	22.2
	A-3	16 : 0/20 : 4	54.4	39.8
	A-4	Unidentified	4.7	2.5
	A-5	18 : 0/20 : 4	18.9	11.4

a) The peaks are shown in Fig. 7.

b) Concentration of fatty acid exposed in articular chondrocytes.

c) [<sup>14</sup>C] Oleate was incubated with cells for 8 hours.d) [<sup>14</sup>C] Linoleate was incubated with cells for 8 hours.e) [<sup>3</sup>H] Arachidonate was incubated with cells for 8 hours.

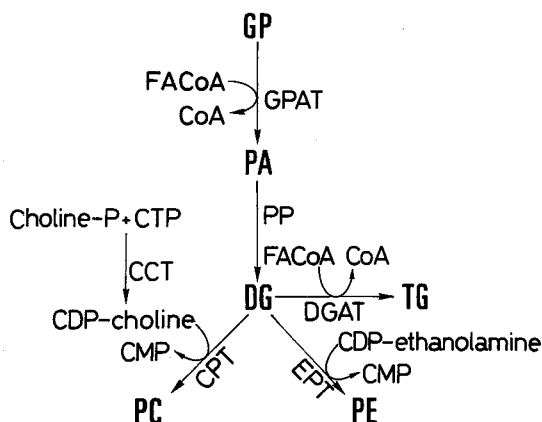
f) Possibly 18 : 2/20 : 4 species.

g) Possibly 18 : 1/20 : 4 species.

ル、標識脂肪酸共に TG への取り込みが PC よりも高くなることを示した。特に TG のアラキドン酸含量は極めて低いにもかかわらず、高濃度アラキドン酸で培養した時、標識アラキドン酸の TG への取り込みは PC への取り込みより著しく高かった。この結果は、関節軟骨細胞におけるアラキドン酸の利用と代謝の特色を示すものとして注目される。

Kirkpatrick *et al.*<sup>3)</sup> は家兎軟骨細胞を細胞外アラキドン酸あるいはジホモ- $\gamma$ -リノレン酸高濃度(100  $\mu$ M)で培養した時、細胞内に脂肪滴の沈着を認めている。組織学的に観察されたこの Kirkpatrick *et al.*<sup>3)</sup> の結果は、生化学的に検討した著者の結果と一致する。細胞外脂肪酸濃度の変化によって脂肪酸が TG に蓄積されるのは肝細胞<sup>8,9)</sup>、血管平滑筋細胞<sup>10)</sup>、血管内皮細胞<sup>11)</sup>、線維芽細胞<sup>24)</sup> など多くの培養細胞で観察されている。血管平滑筋細胞<sup>10)</sup>、血管内皮細胞<sup>11)</sup>、3T3-L1 細胞<sup>12)</sup> などではリン脂質に結合するアラキドン酸からプロスタグ

ランジンを活発に生成するが、これらの細胞は TG に大量のアラキドン酸を取り込むことが知られている。すなわち、血管内皮細胞の TG のアラキドン酸含量は通常の培養条件下では非常に低いが、細胞外アラキドン酸濃度を 50~100  $\mu$ M に上げると標識アラキドン酸は TG に蓄積され、再び元の培養液へ戻すと TG へ蓄積された標識アラキドン酸はリン脂質へ移行することが報告された<sup>11)</sup>。つまり TG はプロスタグランジンの前駆物質であるアラキドン酸の一時的な storage site となっており、TG に結合したアラキドン酸は膜リン脂質へのアラキドン酸の供給と turnover に関して重要な役割を持つことが指摘された。また、Tsai and Geyer<sup>24)</sup> は L-fibroblast を用いて細胞外脂肪酸の供給を止めると、TG へ蓄積された脂肪酸はリン脂質へ移行すると報告している。これらの事実では TG が脂肪酸の貯蓄及びリン脂質への脂肪酸の供給源としての役割を担っていると同時に TG とリン脂質の間には脂肪酸の移動に関して



**Fig. 8** Reactions involved in synthesis of triacylglycerol and phospholipids from diacylglycerol as the branch point.

GP; glycerol-3-phosphate, PA; phosphatidic acid, DG; diacylglycerol, TG; triacylglycerol, PC; phosphatidylcholine, PE; phosphatidylethanolamine, GPAT; glycerol-3-phosphate acyltransferase, PP; phosphatidate phosphatase, CPT; cholinephosphotransferase, EPT; ethanolaminephosphotransferase, DGAT; diacylglycerol acyltransferase, CCT; cholinephosphocytidyltransferase, FAcCoA; fatty acyl CoA.

なんらかの調節機構が存在していることを示唆している。本研究の結果は、関節軟骨細胞が上記の細胞と同じように、細胞外アラキドン酸が高濃度の時、TGに大量のアラキドン酸を取り込むことを示した。すなわち関節軟骨細胞においてTGは脂肪酸、特にアラキドン酸の一時的なstorage siteとして重要な役割を持つと考えられる。

TGとリン脂質の合成は、細胞外脂肪酸濃度により調節されていることが示されたが、この調節はいかなる機構によるのか。Fig. 8に示すようにグリセロール酸に二つの脂肪酸が結合してホスファチジン酸が生成され、次いでホスファチジン酸ホスファターゼでDGへ導かれる。このDGとCDP-コリンあるいはCDP-エタノールアミンからPC、PEが生成される。一方、DGに脂肪酸が結合してTGが生成する<sup>25)</sup>。このDGを分岐点としたリン脂質合成とTG合成が脂肪酸によって調節される機構が提起されてきた。Lamb and McCue<sup>8)</sup>は肝細胞において細胞外脂肪酸濃度が高い時TG合成が促進される機構として、高濃度脂肪酸(彼らは1 mMを使用している)の添加によってホスファチジン酸ホスファターゼ活性が上昇しDGを供給するが、DG量の上昇に見合うCDP-コリン量の増加はないので、生成されたDGに過剰に存在する脂肪酸が結合してTG合成が亢

進されるとした。Haagsman and Van Golde<sup>26)</sup>は脂肪酸の添加が肝細胞のDGアシルトランスフェラーゼの活性上昇をもたらすと報告している。脂肪酸がこれらの酵素活性を上昇させる機構は不明であるが、肝細胞に高濃度脂肪酸が与えられた時にみられるTG合成の亢進は、脂肪酸によって両酵素の活性が上昇するためと考えられる。関節軟骨細胞の脂肪酸によるTG合成の亢進は同様の機構によるのか今後の検討が必要であろう。また、関節軟骨細胞のリン脂質合成については、高濃度脂肪酸によってPC合成は亢進されたが、PE、PI合成の亢進はなかった。Vance and Pelech<sup>27)</sup>は肝細胞において脂肪酸がPC合成の律速段階酵素と考えられるCTP:ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをcytosol(不活性型として存在)からミクロソームへtransferして活性型に変換、CDP-コリンを生成してPC合成が亢進することを示した。関節軟骨細胞のリン脂質の中で、脂肪酸によりPC合成のみが亢進するのはこの機構によるのかも知れない。

Bonner *et al.*<sup>2)</sup>は各年代別にヒト関節軟骨の表層、深層の脂質分析を行って、表層、深層共に年齢が高くなるほど総脂質が多くなり、脂質沈着と軟骨変性との関連を示唆している。彼らのデータをみると高年齢者の関節軟骨では、特にTGの蓄積が著明である。またRabinowitz *et al.*<sup>28)</sup>はヒト膝関節軟骨の脂質組成を検討し中性脂質が64.5%、リン脂質が34.5%であり中性脂質がリン脂質の1.9倍あったと報告している。彼らは剖検で得られた材料を用いており、年齢層が広いため中性脂質がリン脂質よりも多い結果が得られたと考えられる。前報<sup>14)</sup>において著者は幼若家兎関節軟骨細胞においてリン脂質はTG量の2.8倍であることを報告した。これらの結果は、加齢に伴って関節軟骨細胞及び基質に中性脂質、特にTGが蓄積することを示している。すなわち、老化の進展によって関節軟骨にTGの沈着が増し、これが関節軟骨の退行変性に深く関わっているのは事実と思われる。本研究は、細胞外脂肪酸濃度が軟骨細胞のTG合成を調節していることを示したが、老化の進行によって血液-滑膜関門の障害が惹起され比較的高濃度の脂肪酸が軟骨細胞に供給されるならば、この機構により細胞内TGが次第に蓄積されていく可能性が考えられる。

標識グリセロールのPC分子種への取り込みは、*de novo*合成経路で生成されるPC分子種の割合を示す。肝の場合、標識グリセロールはオリゴエン種(モノエン種とジエン種)に大量に取り込まれ、テトラエン種への取り込みは非常に少ない。つまり肝では*de novo*経

路によってオリゴエン種(主としてパルミトイル分子種)が生成されることが知られている。関節軟骨細胞ではモノエン種への取り込みが最大であったが、ジェン種、テトラエン種、ポリエン種の放射活性はほぼ同じであり、個々の分子種としては16:0/18:1, 16:0/18:2と共に16:0/20:4への取り込みが著明であった。本研究のインキュベーション時間は2時間であり標識PCが再修飾されている可能性は否定できないが、軟骨細胞では16:0/20:4が*de novo*経路で生成されていることを示唆する結果であった。とするならば、グリセロリン酸アシルトランスフェラーゼによる脂肪酸選択性が、肝の場合とは明らかに異なっている可能性があり今後の課題であろう。

高濃度脂肪酸の培養によるPC分子種の著明な変化が標識脂肪酸の取り込みによって示された。すなわち細胞外不飽和脂肪酸が低濃度(5  $\mu$ M)の時は、飽和-不飽和型分子種、特にパルミトイル分子種へ標識脂肪酸は最も取り込まれた。しかし不飽和脂肪酸高濃度(500  $\mu$ M)の場合は、飽和-不飽和型分子種におけるパルミトイル分子種の割合が低下した。さらに不飽和-不飽和型分子種の割合が著しく増加した。この場合、特定の不飽和-不飽和型分子種が生成されることが注目される。オレイン酸高濃度では18:1/18:1, 18:1/18:2, リノール酸高濃度では16:1/18:2の割合の増加が著明であった。アラキドン酸高濃度では18:2/20:4と思われるピークの割合が著しく増加した。すなわち特定の不飽和脂肪酸が高濃度の時、PC分子種生成における脂肪酸選択性、おそらくグリセロリン酸アシルトランスフェラーゼとリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼのアシルCoA選択性が失われて、パルミトイル分子種と共にステアロイル分子種が生成され、また特定の不飽和-不飽和型分子種が生成されるようになると思われる。高濃度脂肪酸によりTG合成の亢進と共にPC合成の亢進が起こるが、この場合に生成されるPCは、低濃度脂肪酸時に生成されるPCとは質的に異なるPCであることに留意せねばならない。このような不飽和-不飽和型PCの増量は、膜流動性を増加せしめ、膜酵素活性あるいは膜蛋白の機能に変調をもたらし、それが軟骨細胞の代謝に影響を及ぼしていることが考えられる。

## 5 結 論

幼若家兔関節軟骨細胞に標識グリセロール、脂肪酸を取り込ませ、この軟骨細胞における脂質合成、特に細胞外脂肪酸の影響を検討し、次の結果を得た。

1) 脂肪酸無添加の時、TGとPCへの $[^3\text{H}]$ グリセロールの取り込みは同程度であったが、培養液中の脂肪酸濃度の上昇と共にTGへの取り込みは著しく増加した。この時点でのPCへの取り込みも増加したが、PE、PIへの取り込みに変化はなかった。

2) 脂肪酸無添加の時、 $[^3\text{H}]$ グリセロールから合成されるPC分子種はモノエン種>ジェン種=テトラエン種=ポリエン種であった。脂肪酸高濃度の時、オレイン酸では16:0/18:1, リノール酸では16:0/18:2, 16:0/20:4, アラキドン酸では16:0/20:4の合成が促進された。

3) 標識オレイン酸, リノール酸, アラキドン酸は培養液中のそれぞれの脂肪酸が低濃度の時、TGよりもPCへ取り込まれるが、脂肪酸濃度の上昇と共にTGへの取り込みはPCより高くなった。この時点で、標識アラキドン酸のTGへの取り込みはPCの4倍で、最も高かった。

4) 細胞外オレイン酸が低濃度の時、標識オレイン酸のPC分子種への取り込みは16:0/18:1が高いが、高濃度の時は18:1/18:1, 18:1/18:2の割合が増加した。リノール酸の場合、低濃度では16:0/18:2, 16:1/18:2への取り込みは同程度であるが、高濃度では16:1/18:2の割合が著明に増えた。アラキドン酸は低濃度、高濃度で16:0/20:4への取り込みが最大であるが、高濃度の時18:2/20:4と思われる分子種の割合が増加した。

以上の結果から、関節軟骨細胞脂質代謝の特色は、1)細胞外脂肪酸濃度によりTG合成、PC合成が調節され、特に高濃度脂肪酸存在下でTG合成は促進するが、PE、PI合成は脂肪酸により影響されない、2)TGのアラキドン酸含量は非常に低いにもかかわらず、TGへ標識アラキドン酸は大量に取り込まれる、3)*de novo*合成経路ではPCの16:0/18:1, 16:0/18:2に加えて16:0/20:4分子種が生成されると思われる、4)高濃度脂肪酸存在下では、質的に異なったPCの合成が促進し、特定の不飽和脂肪酸高濃度の時、特定のPC不飽和-不飽和型分子種が生成される、と要約される。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲下さいました本学生化学第1講座秋野豊明教授並びに本学整形外科科学講座石井清一教授に深謝いたします。さらに、御助言、御教示頂いた本学生化学第1講座の諸先生に感謝いたします。

本論文の要旨は第28回日本脂質生化学研究会(名古屋, 昭和61年)において発表した。

## 文 献

1. Stockwell, R. A.: Lipid in the matrix of ageing articular cartilage. *Nature* **207**, 427-428 (1965).
2. Bonner, W. M., Jonsson, H., Malanos, C. and Bryant, M.: Changes in the lipids of human articular cartilage with age. *Arthritis Rheum.* **18**, 461-473 (1975).
3. Kirkpatrick, C. J., Mohr, W., and Haferkamp, O.: Lipid storage in cultured articular chondrocytes due to prostanoid precursors and a prostanoid synthesis inhibitor. *Cell Tissue Res.* **224**, 441-448 (1982).
4. Mitrovic, D., McCall, E. and Dray, F.: The *in vitro* production of prostanoids by cultured bovine articular chondrocytes. *Prostaglandins* **23**, 17-28 (1982).
5. Malemud, C. J., Moskowitz, R. W. and Papay, R. S.: Correlation of the biosynthesis of prostaglandin and cyclic AMP in monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **715**, 70-79 (1982).
6. Malemud, C. J., Moskowitz, R. W. and Hassid, A.: Prostaglandin biosynthesis by lapine articular chondrocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **663**, 480-490 (1981).
7. Mitrovic, D.: Synovial cartilage interactions with special reference to the prostanoids as metabolic agents in cartilage under normal and pathological conditions. *Eur. J. Rheumatol. Inflamm.* **5**, 3-14 (1982).
8. Lamb, R. G. and McCue, S. B.: The effect of fatty acid exposure on the biosynthesis of glycerolipids by cultured hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **753**, 356-363 (1983).
9. Groener, J. E. M. and Van Golde, L. M. G.: Utilization of exogenously added and endogenously synthesized fatty acids for glycerolipids synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **529**, 88-95 (1978).
10. Gavino, V. C., Miller, J. S., Dillman, J. M., Milo, G. E. and Cornwell, D. G.: Polyunsaturated fatty acid accumulation in the lipids of cultured fibroblasts and smooth muscle cell. *J. Lipid Res.* **22**, 57-62 (1981).
11. Denning, G. M., Figard, P. H., Kaduce, T. L. and Spector, A. A.: Role of triglycerides in endothelial cell arachidonic acid metabolism. *J. Lipid Res.* **24**, 993-1001 (1983).
12. Hyman, B. T., Stoll, L. L. and Spector, A. A.: Prostaglandin production by 3T3-L1 cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **713**, 375-384 (1982).
13. Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
14. 長尾正人: 関節軟骨の脂質代謝に関する研究; 第1報 関節軟骨細胞の脂質組成. *札幌医誌* **55**, 239-249 (1986).
15. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **227**, 497-509 (1957).
16. Arvidson, G. A. E.: Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur. J. Biochem.* **4**, 478-486 (1968).
17. Okano, G., Akino, T. and Mochizuki, Y.: Molecular composition of lecithins in the primary hepatoma induced by 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Tohoku J. Exp. Med.* **122**, 21-33 (1977).
18. Itoh, K., Suzuki, A., Kuroki, Y. and Akino, T.: High performance liquid chromatographic separation of diacylglycerol acetates to quantitate disaturated species of lung phosphatidylcholine. *Lipids* **20**, 611-616 (1985).
19. Nakagawa, Y. and Horrocks, L. A.: Separation of alkenylacyl, alkylacyl, diacyl analogues and their molecular species by high performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **24**, 1268-1275 (1983).
20. Morrison, W. R. and Smith, L. M.: Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* **5**, 600-608 (1964).
21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
22. Bartlett, G. H.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1959).
23. Snyder, F.: Radioassay of thin-layer chromatograms: A high-resolution zonal scraper for quantitative  $C^{14}$  and  $H^3$  scanning of thin-layer chromatograms. *Anal. Biochem.* **9**, 183-196 (1964).
24. Tsai, P.-Y. and Geyer, R. P.: Effect of exogenous fatty acids on the retention of phospholipid acyl groups by mouse L fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **528**, 344-354 (1978).
25. Van Golde, L. M. G. and Van den Bergh, S. G.: Introduction; general pathway in the metabolism

- of lipids in mamalian tissues. In: Snyder, F. (ed.): *Lipid Metabolism in Mammals*. **1**, 1-33, Plenum Press, New York (1977).
26. Haagsman, H. P. and Van Golde, L. M. G.: Synthesis and separation of very low density lipoproteins by isolated rat hepatocytes in suspension: role of diacylglycerol acyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 395-402 (1981).
27. Vance, D. E. and Pelech, S. L.: Enzyme translocation in the regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 17-20 (1984).
28. Rabinowitz, J. L., Gregg, J. R., Nixon, J. E. and Schumacher, H. R.: Lipid composition of the tissues of human knee joints. I. Observations in normal joints (articular cartilage, meniscus, ligaments, synovial fluid, synovium, intra-articular fat pad and bone marrow). *Clin. Orthop.* **143**, 260-265 (1979).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学整形外科科学講座 長尾正人